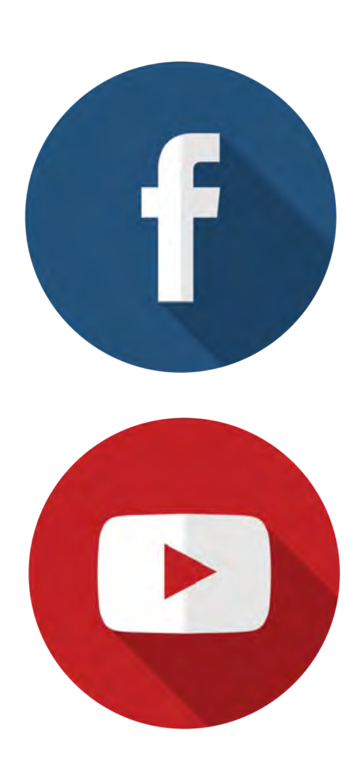
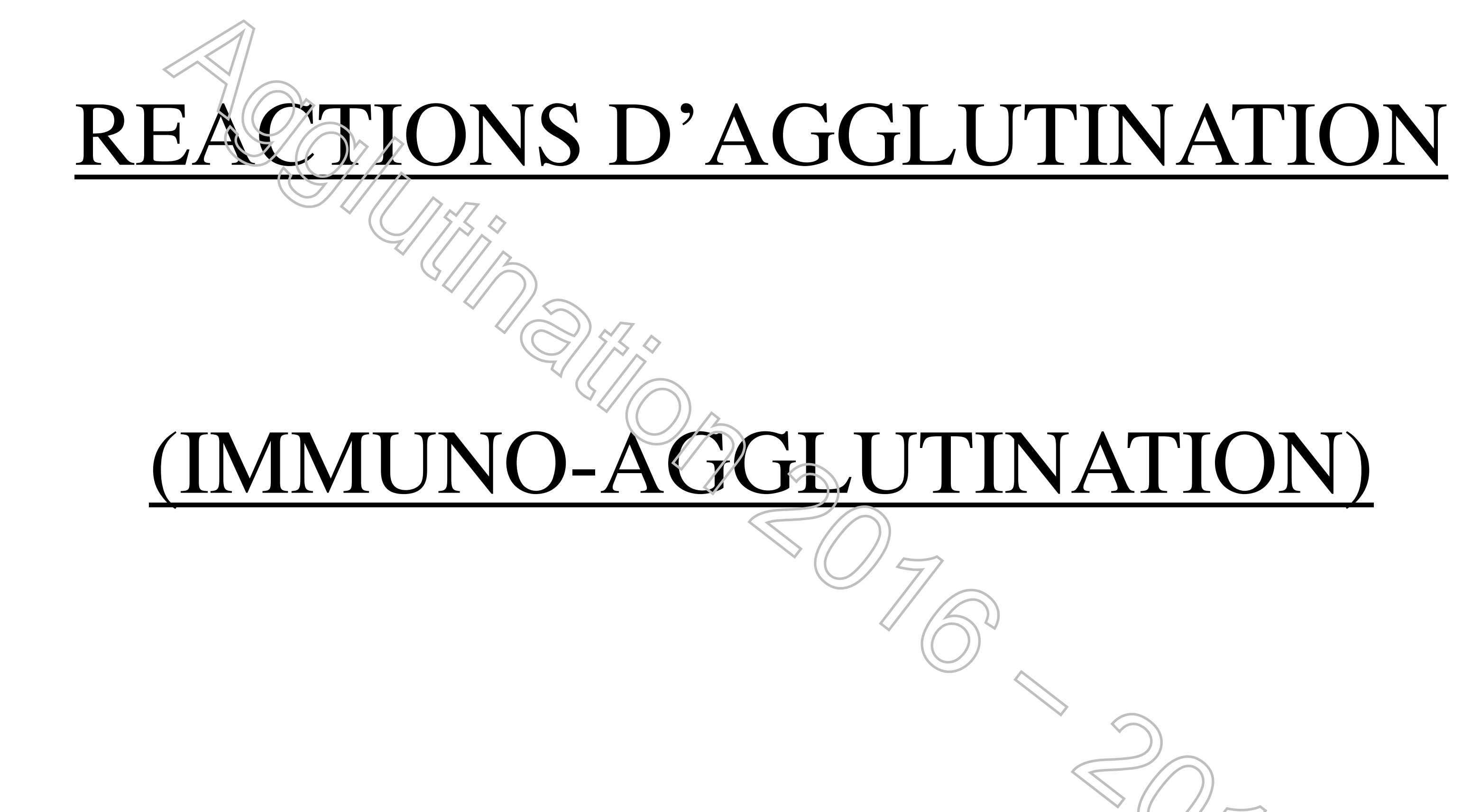
In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful





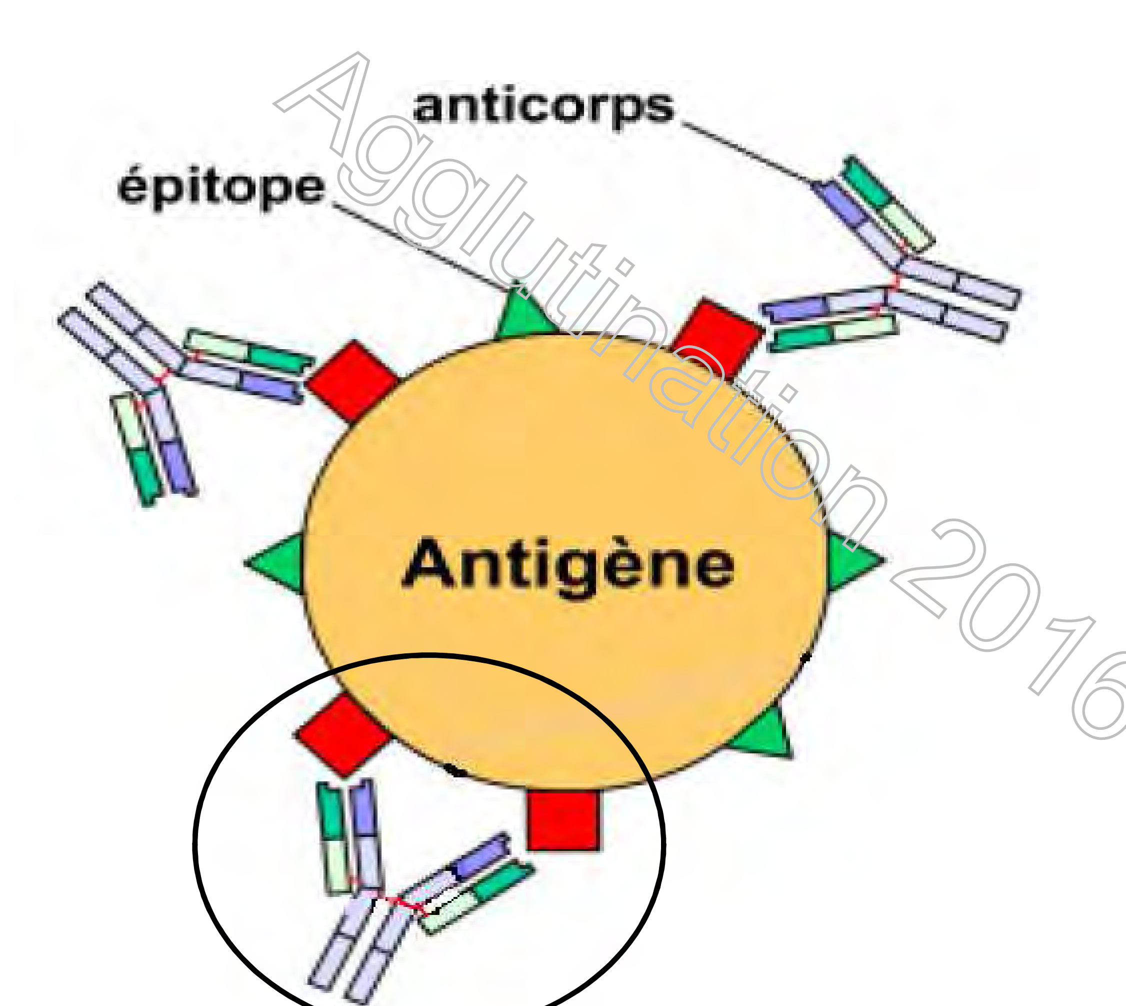




REACTIONS D'AGGLUTINATION

(IMMUNO-AGGLUTINATION)

INTERACTIONS Ag-Ac



Réaction entre un épitope et un paratope

Phénomène:

- rapide
- invisible
- constant
- commun à toutes les réactions Ag-Ac

- Spécificité ++++

UTILISATIONS DE L' INTERACTION Ag-Ac

1. Utilisations pratiques:

   – Diagnostic in vitro.

   – Diagnostic in vivo.

   – Thérapie ciblée.

2. Utilisations plus fondamentales:

- Préparation de réactifs à usage in vitro ou in vivo.
- Compréhension de mécanismes fondamentaux.
- Compréhension de pathologies.

Selon l’antigène recherché

1. Identification et/ou dosage d’un Ag :

   – Identification d’une cellule, d’un agent infectieux.
   – Identification et/ou dosage d’une protéine.
   – Dosage d’une hormone, d’un médicament

2. Mise en évidence et/ou titrage d'un Ac :

- Diagnostic et suivi sérologique d'une infection ou d'une maladie auto-immune.
- Diagnostic sérologique d'une allergie.
- Suivi d'une grossesse ou d'une transplantation.

Méthodes basée sur la réaction Ag-Ac et n'utilisant pas de marqueurs

- Immunoprécipitation
- Agglutination
- Fixation du complément.

DEFINITION AGGLUTINATION

Réaction en **amas de particules** à la suite d'une réaction Ag - Ac

Ag est présent à la surface d'une particule (naturel ou figuré) et l'Ac agglutinant et ajouter au milieu

Agglutination

Formation d'un complexe immun entre des antigènes particulaires et les anticorps spécifiques agglutinants.

- Ce complexe immun est **visible à l'œil** nu sous forme d'amas.
- Sensibilité = 0,001 à 0,3 mg/l
- C'est un mécanisme d'agglutination qui a permis de découvrir les groupes sanguins.

  En présence d'un anticorps, les érythrocytes au lieu de rester séparés dans le plasma sanguin, se collent les uns aux autres et forment des agglutinats visibles à l'œil nu.
- Technique de base de l'immuno-hématologie, pour la détermination des groupes sanguins et la recherche des anticorps irréguliers.

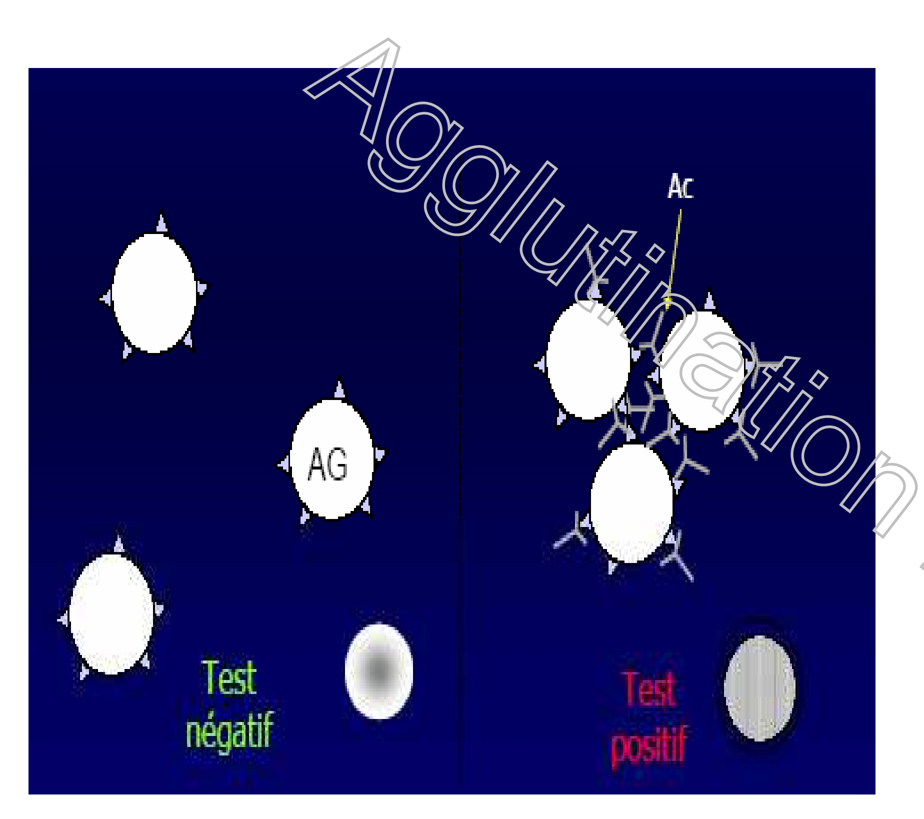
Types d'agglutination immunologique :

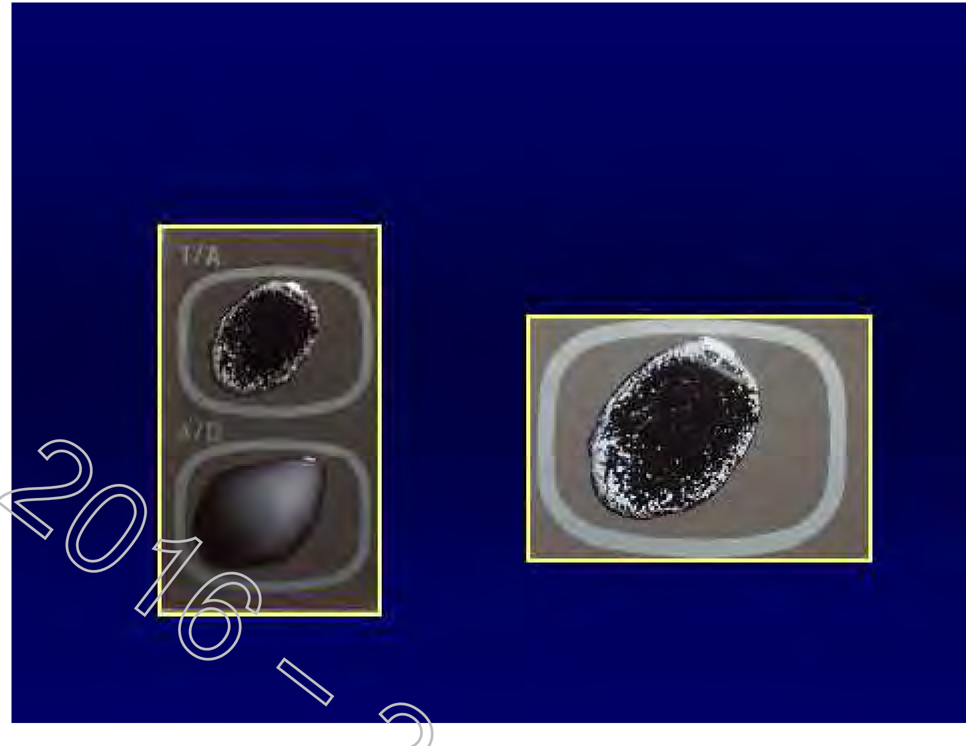
- Agglutination directe = active → faisant appel à des Ag particulaires → bactéries, hématies

- Agglutination indirecte = passive → mettant en jeu des particules support sur lesquelles on fixe les Ag solubles.

- Inhibition de l'agglutination passive.

Principe de la réaction d'agglutination





Formation d'un réseau ⟶ Pour sa réalisation, il faut ↓ les forces électrostatiques de répulsion entre cellules + création de ponts entre les cellules.

TYPES D'ANTICORPS

1. Les Ac agglutinants:

Agglutinent les cellules dans une solution de NaCl 0,15 mol/l (0,9%)

IgM → agglutination directe

TYPES DE PARTICULES

1. Dans le cas de l'agglutination directe → l'Ag appartient à la particule (naturel).

Si la particule est:

- GR → Hémagglutination
- GB → Leucoagglutination
- Plaquette → Thromboagglutination
- Bactéries.

→ On connaît l'Ag et on cherche l'Ac.

2. Dans les autres cas → il faut fixer l'Ag sur les particules (figuré) :

- GR de différentes espèces
- Particules inertes → cristaux de cholestérol, particules de charbon ou de latex.

PARAMETRES INTERVENANT DANS L'AGGLUTINATION

1. Nombre de sites à la surface de la particule:

   Est +++ : Ac agglutinant peut devenir non agglutinant si le nombre de sites est insuffisant.

- Crypto antigènes : inaccessibles à l'Ac

2. **Influence de la T°:**

T° est directement lié à la structure de l'Ac étudié :

- IgM = Ac à optimum thermique froid : Ac froids (4°C)
- IgG = Ac à optimum thermique chaud : Ac chauds (37°C)

3. **PH neutre :**

4. **La force ionique:** elle contrarie l'union Ag-Ac mais favorise la formation du réseau par la diminution du potentiel ζ.

S'il y a moins de cations, les cellules se rapprochent.

Pour avoir une bonne agglutination, il faut diminuer ζ pour augmenter la force ionique du milieu.

Pour cela, on ajoute du Na Cl et on utilise des tampons avec une grande force ionique.

Concentrations de l' Ag et de l'Ac

Phénomène de Prozone (Phénomène de zone)

- A forte concentrations d'Ac, le nombre de sites de liaison de l'Ac peut excéder celui des épitopes antigéniques.
- Les Ac ne se lient à l'Ag que d'une façon univalente , Il n'y a donc pas de formation de l'agglutination.
- S'observe avec certains sérums (anti-brucelliques).
- Le même phénomène de prozone se produit également en excès d'Ag.

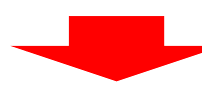
1-Aspect qualitatif

Suivant le système Ag - Ac étudié la réaction peut s'effectuer en tubes ou sur lame de verre.

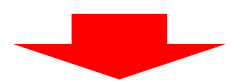
Réaction d'agglutination en tubes

Sérum + Ag figurés (GR, bactéries)

Après incubation, on agite légèrement le tube.



Formation d'un culot de sédimentation.



Lecture se fait à l'œil nu.



Culot se fragmente en amas très nets → Réaction (+)

La Reaction d'Agglutination en tubes:
(Methodes quantitatives)

- Serodiagnostic de Widal: Salmonelloses
- Serodiagnostic de Weil et Felix : Brucellose
- Serodiagnostic de Martin et Petit :Leptospiroses

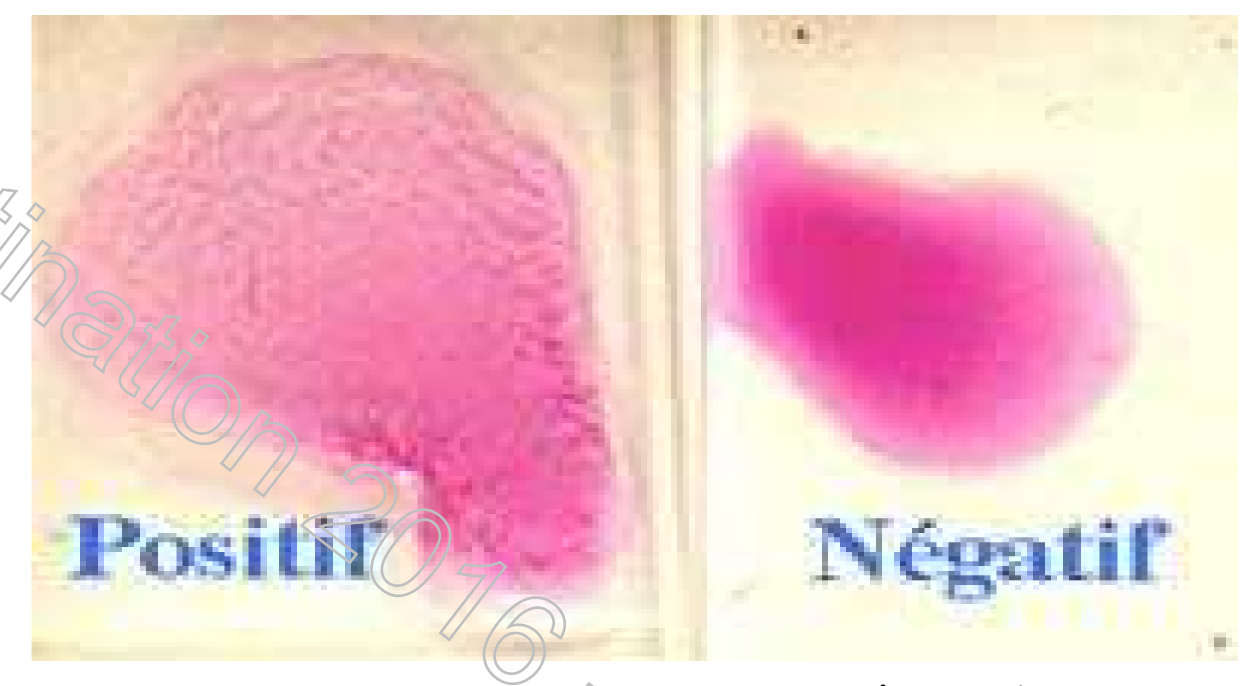
Réaction d'agglutination sur lame

01 goutte de sérum

+

01 goutte de suspension antigénique.

Lecture se fait au microscope



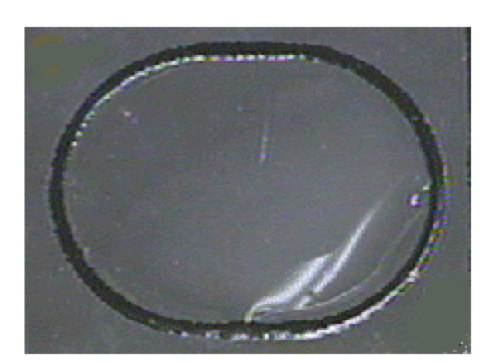
Amas ± volumineux, tandis que le fond de la préparation s'éclaircit

Préparation reste homogène

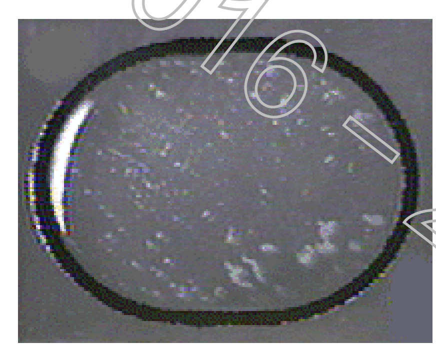
Technique sur lame. Exemple du sérotypage des Ag O, H et Vi chez *Salmonella*

- Si la souche possède l'antigène correspondant à l'antisérum testé, il se forme des agglutinats visibles à l'œil nu (parfois plus visibles si on regarde la lame par dessous)
- cette agglutination repose sur la détermination des antigènes O qui donne une **agglutination grumuleuse**

Test négatif



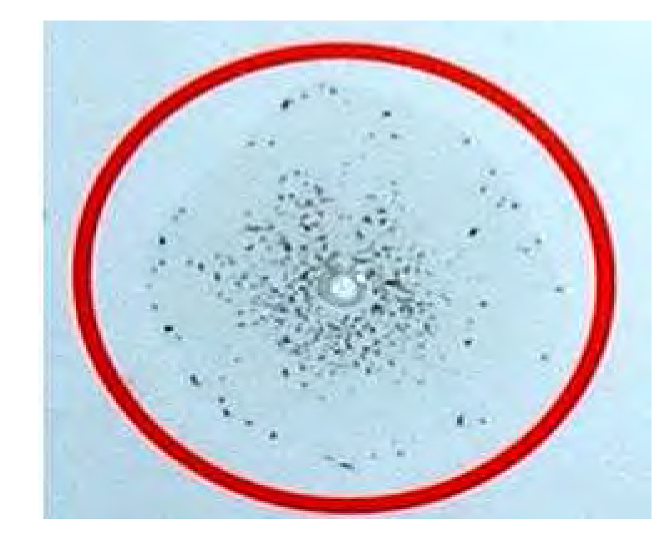
Test positif



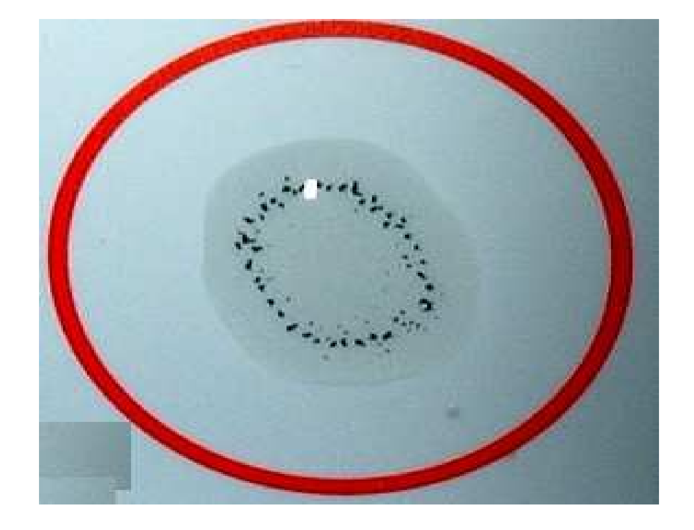
Comment lire les résultats ?



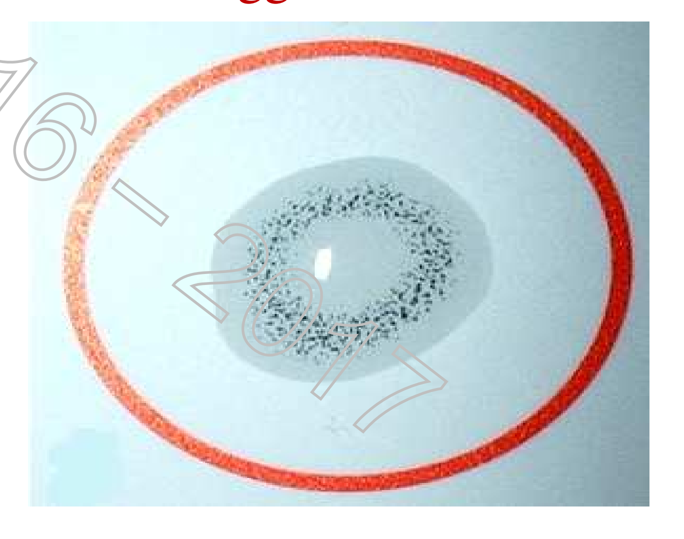
Pas d'agglutination



Agglutination +



Agglutination ++

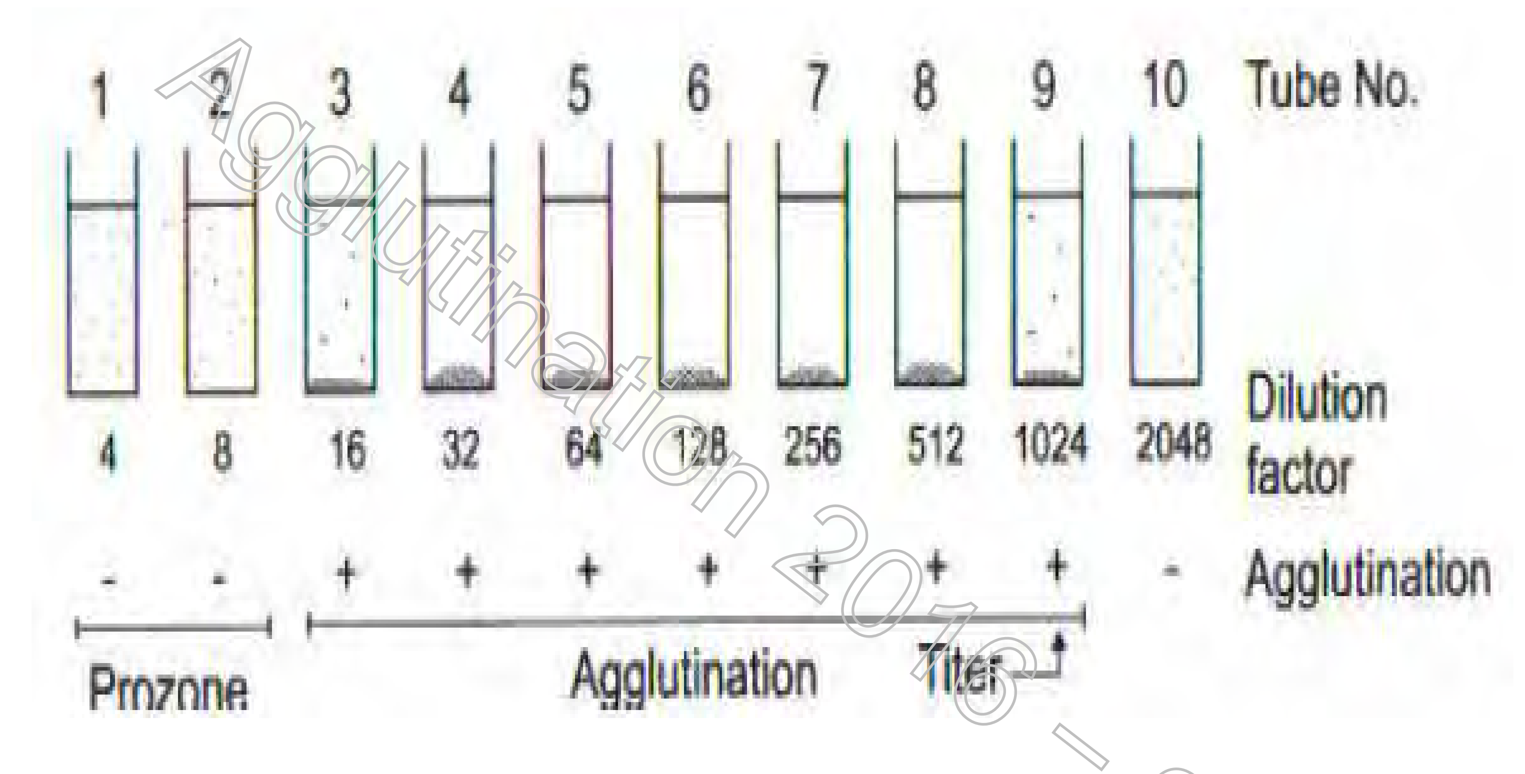


Agglutination +++

2. Aspect quantitatif

- Réactions d'agglutination, permettent de détecter de faibles quantités d'Ac.
- Méthode de dilutions successives .
- Méthode semi quantitative.

Titrage des réactions d'agglutination sur tubes



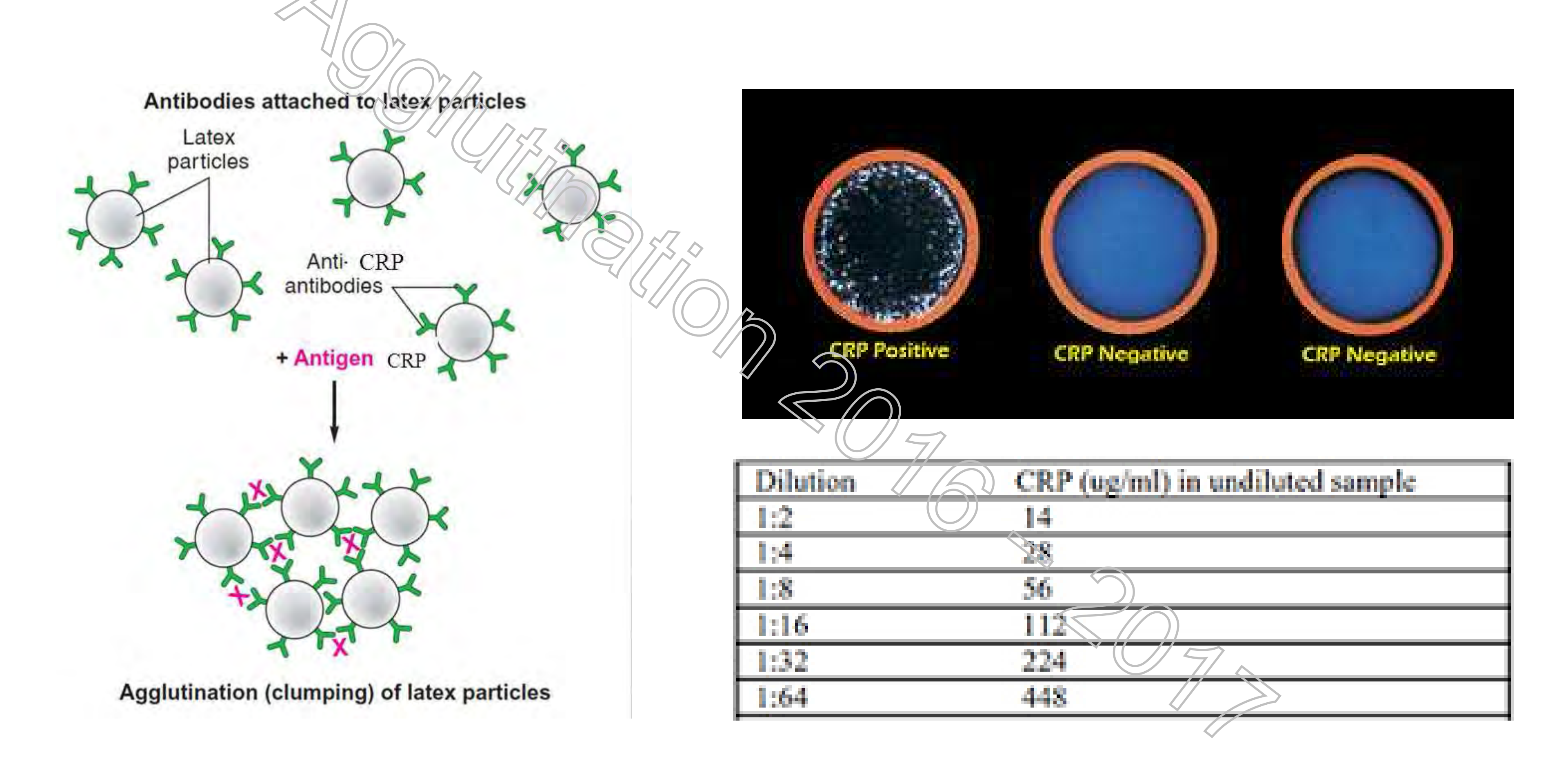
Série de tubes dans lesquels on introduit des quantités fixes d'Ag
+
dilutions successives du sérum.

Si Ac est présent dans le sérum → Agglutination

Titre en Ac du sérum correspond à la dilution la plus grande associée à une agglutination franche.

Titrage des réactions d'agglutination sur lame

Dosage de la C-Reactive Protein (CRP)



Dilution	CRP (ug/ml) in undiluted sample
1:2	14
1:4	28
1:8	56
1:16	112
1:32	224
1:64	448

3. Applications

La réaction d'agglutination est à la base de nombreuses techniques sérologiques utilisées à des fins de diagnostic ou de recherche.

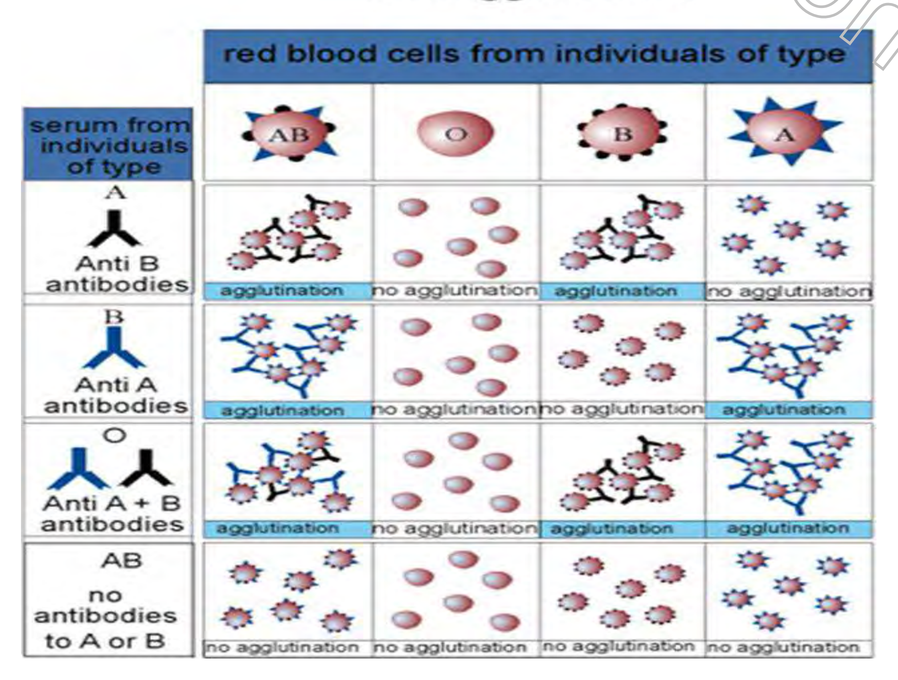
a. Hémagglutination directe :

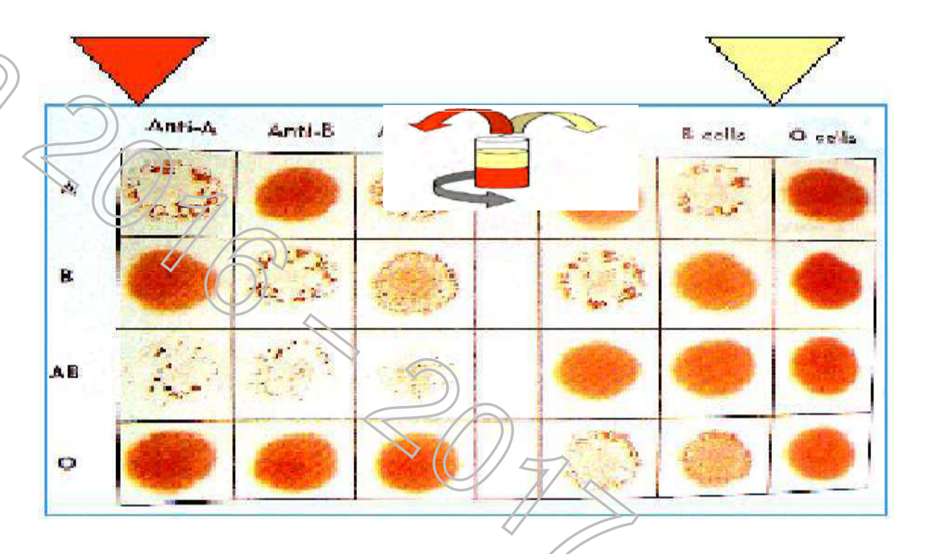
- Groupage ABO et Rhésus
- Recherche d'Ac anti-érythrocytaires pathologiques:
  - Anémie Hémolytique auto immune,
  - post-transfusionnels
  - iso-immunisation fœto-maternelle

- Ac anti ABO **IgM** naturels sont chargées négativement et vont attirer les cellules positivement chargées.
- Ce sont des Ac réguliers (présents quand l'Ag correspondant est absent et inversement.)

Les globules rouges du sang possèdent à leur surface l'épitope A et/ou B ou aucun de ces deux épitopes.

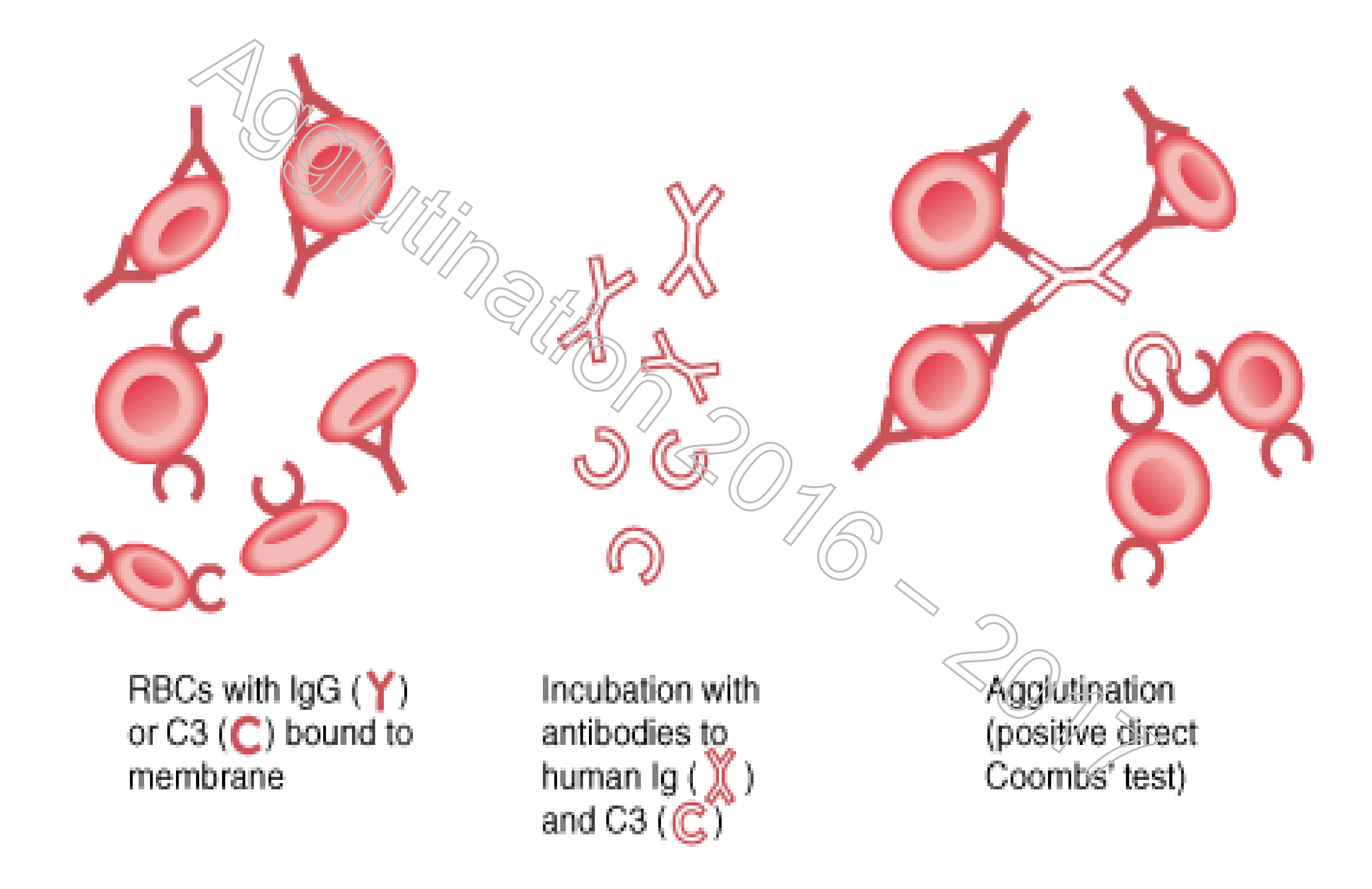
Ce qui permet la détermination des groupes sanguins dans le système ABO selon les méthodes de Beth Vincent et Epreuve de Simonin.



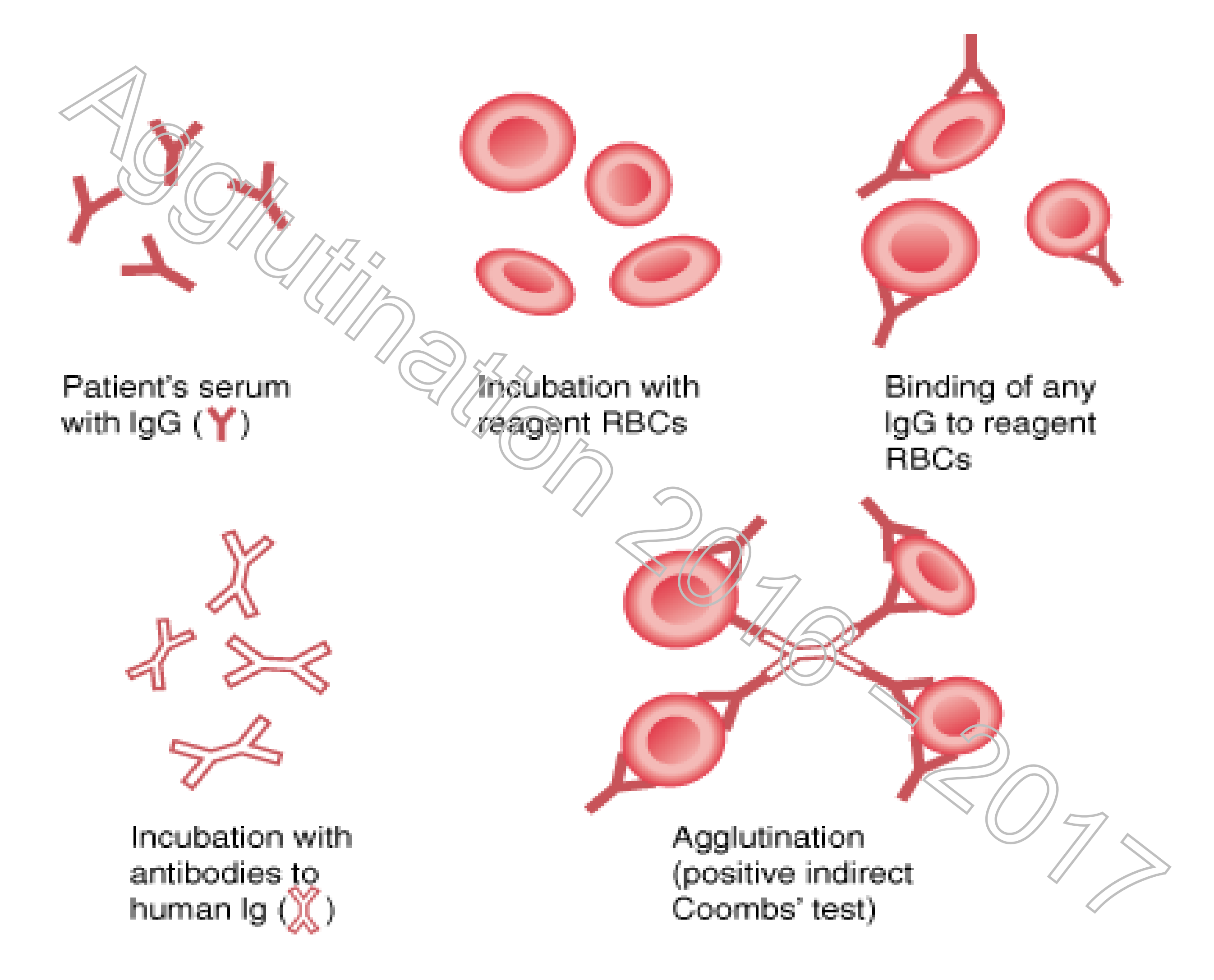


Test de Beth-Vincent	Epreuve de Simonin-Michon
identification des AG érythrocytaires	identification des AC sériques

Test de Coombs direct



Test de Coombs indirect



b. Réactions d'agglutination directe de bactéries :

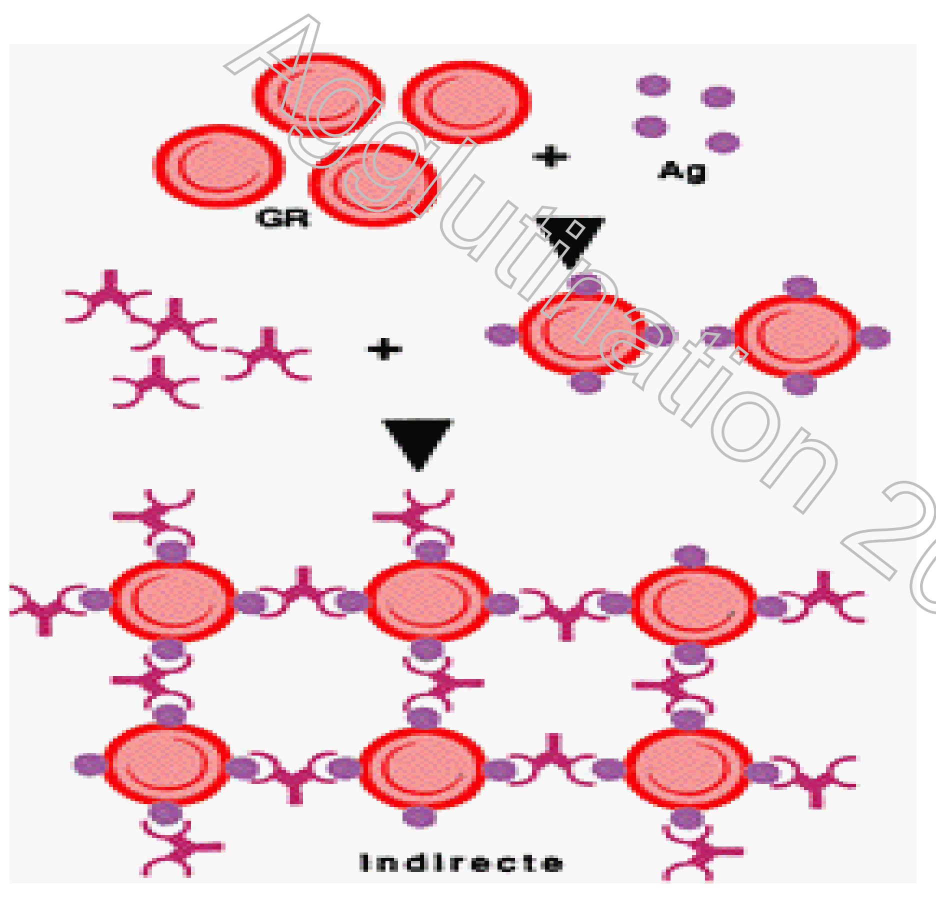
- Réaction de Whright : brucellose → agglutination d'une suspension de brucelles par le sérum de malade atteint de fièvre de Malte.
- Réaction de Widal et Felix salmonelloses.
- Typage et recherche de germes E. Coli, streptocoques.

REACTIONS D'AGGLUTINATION PASSIVE

Permettent de visualiser un certain nombre de réactions Ag - Ac invisibles ou discrètes, en les faisant bénéficier de la grande sensibilité des réactions d'agglutination.

La nature des particules figurées utilisées comme support est variable :

- Cristaux de cholestérol
- Particules de latex.



Fixer un Ag soluble sur un support figuré inerte, n’intervenant pas directement dans la réaction Ag - Ac.

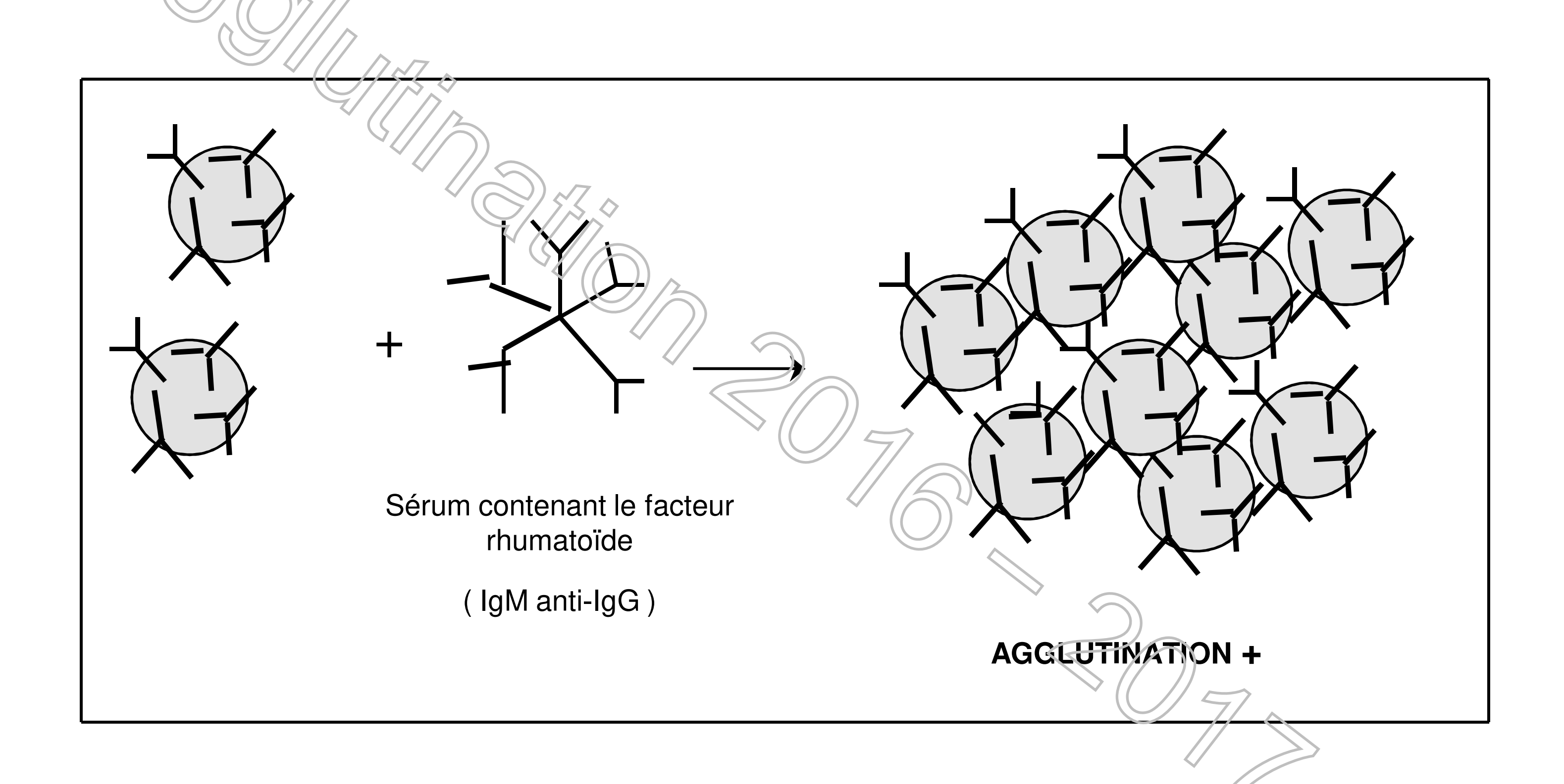
La présence des Ac sera décelée par l’agglutination des particules sensibilisées par l’Ag correspondant.

2. Applications courantes

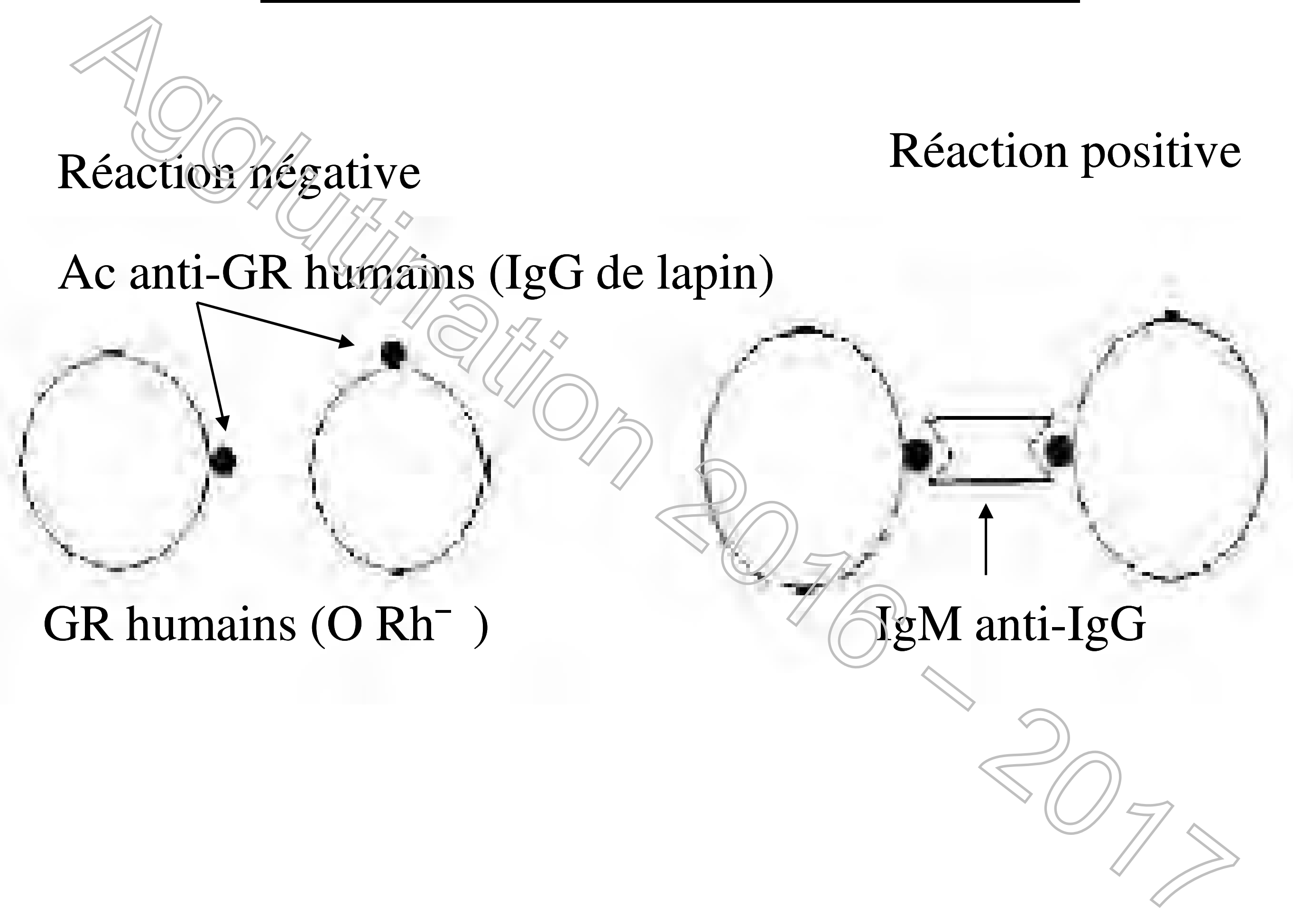
a. Dosage du facteur rhumatoïde :

IgM rencontrée tout particulièrement chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Différents tests permettent de le mettre en évidence :

L'Ag est fixé aux particules de latex par simple contact à pH 8,2



Réaction de Waaler-Rose



REACTIONS D'INHIBITION DE L'AGGLUTINATION PASSIVE



1. Principes

Sont destinées à mettre en évidence un Ag, grâce à des sérums-test (Ac) spécifiques.

Il s'agit de méthodes complexes faisant intervenir :

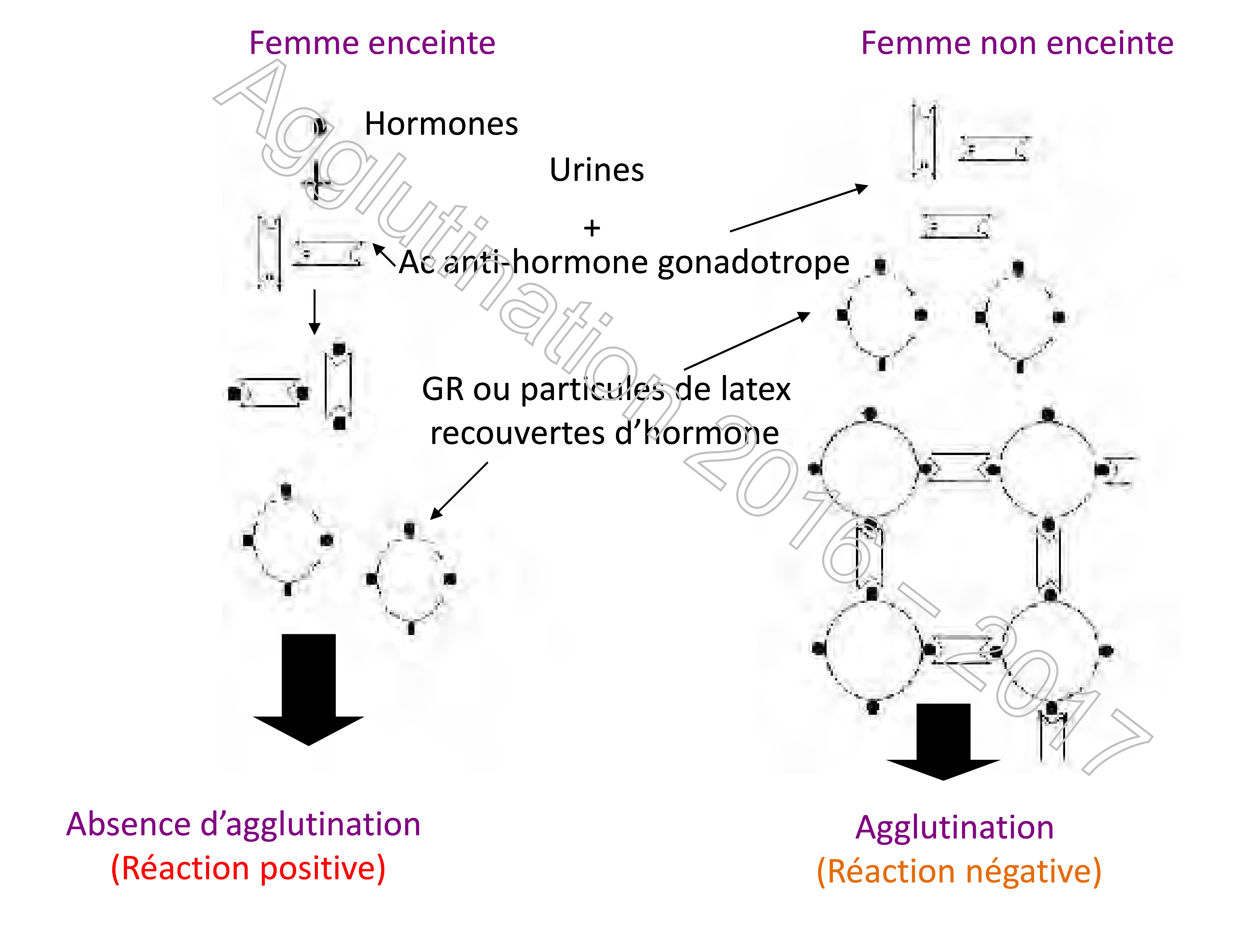
- l'Ag recherché dans un milieu biologique
- un sérum-test adéquat
- et des particules figurées, sensibilisées préalablement par l'Ag correspondant.

Compétition entre un Ag libre , et le même Ag fixé sur une particule.

- **Applications**

- Diagnostic immunologique de grossesse. La grossesse entraîne le passage d'hormones gonadotropes dans les urines (βhCG).
- Diagnostic sérologique d'un certain nombre d'infections virales

Principe des réactions immunologiques de grossesse



SENSIBILITE COMPAREE DES DIFFERENTES METHODES

Tests	Ac µg/ml
Précipitation en milieu liquide	0,5-125
Précipitation en milieu gélifié *diffusion double (Ouchterlony)	3-20
Précipitation en milieu gélifié*diffusion radiale (Mancini)	3-10
Précipitation en milieu gélifié*immunoélectrophorèse	50-200
Agglutination bactérienne	**0,01-0,1**
Hémagglutination directe	**0,03-0,5**
Hémagglutination passive	**0,001-0,03**
Hémolyse	1
Fixation du complément	0,1-1
Immunofluorescence	0,1
radio-immunologiques Immunoenzymatiques Chimilumenecsence	0,00001 à 0,001